Beitrag zur Polysaccharid-Extraktion aus Brucella Abortus

George L. Wolf

Aus dem Tierhygienischen Institut der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. A. Meyn

BEITRAG ZUR POLYSACCHARID-EXTRAKTION AUS BRUCELLA ABORTUS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Veterinärmedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

von

George L. Wolf

aus

Mansfield/Ohio USA

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

München 1959

349/60

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. Zipf

Referent: Prof. Dr. A. Meyn

Tag der Promotion: 28. 7. 1959

UNI-Druck, München 13, Amalienstraße 85

MEINER LIEBEN MUTTER

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554014_0063

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

I. Einleitung 1

II. Literaturbesprechung 2

A. Allgemeines über Polysaccharide 2
1. Definition der Polysaccharide 2
2. Chemischer Nachweis der Polysaccharide 3
3. Gewinnung der Polysaccharide 3

B. Biologische Bedeutung der von Bakterien gewonnenen Polysaccharide 3

C. Die Bedeutung der von Brucellen gewonnenen Polysaccharide 5

III. Eigene Untersuchungen 7

A. Vorversuche 7
1. Mechanische Zerstörung von Brucellen durch wiederholtes Gefrieren und Auftauen 7
2. Zertrümmerung der Bakterien mit Hilfe eines mechanischen Zellhomogenisators 9
3. Fällung der Bakterienproteine mit $CuSO_4$ und Extraktion des Polysaccharids 11

B. Hauptversuche 13
1. Zerstörung der Bakterien durch Säureeinwirkung mit anschließender Hydrolyse 13
2. Fällung der Bakterienproteine mit Trichloressigsäure und Extraktion des Polysaccharids 14
3. Allergische und serologische Untersuchungen an Meerschweinchen 17
a) Intrakutantest an banginfizierten Meerschweinchen 17
b) Sensibilisierungsversuche an Meerschweinchen mit einem Gemisch aus Polysaccharid und Meerschweinchenserum 19
c) Besprechung der Ergebnisse 20

Seite

IV. Diskussion 22

V. Zusammenfassung 23

VI. Literatur 24

Lebenslauf

I. EINLEITUNG

Die Brucellose ist eine weitverbreitete Krankheit, die große Verluste in Rinder- und Schweinebeständen verursachen kann. Um ihre Diagnose zu verbessern, bemüht man sich u. a. auch um die Ausarbeitung allergischer Untersuchungsmethoden.

Amerikanische Forscher (10, 19) isolierten erstmals aus Pneumococcen eine lösliche Substanz, die sie als spezifisches Polysaccharid identifizierten. Auf diesen Erkenntnissen aufbauend gelang es dann auch, spezifische Polysaccharide aus Bang-Bakterien zu extrahieren (Diernhofer 10, Godglück und Schindler 15, Ottosen und Plum 34, Mosimann 31). Durch intrakutane Applikation der auf diese Weise gewonnenen und als Hapten bezeichneten spezifischen Brucellen-Polysaccharide konnten bei banginfizierten Tieren mehr oder weniger starke allergische Hautreaktionen hervorgerufen werden.

Auf Anregung von Herrn Prof. Dr. Meyn habe ich mich in der vorliegenden Arbeit mit methodischen Fragen der Polysaccharid-Gewinnung bei Brucellen befaßt.

II. LITERATURBESPRECHUNG

A. Allgemeines über Polysaccharide

1. Definition der Polysaccharide

Polysaccharide entstehen nach Leuthardt (25) durch Zusammenlagerung von mehreren Monosacchariden unter Wasserabspaltung. Eine andere Definition (Pigmann 35) besagt, daß Polysaccharide Stoffe sind, die nach vollständiger Hydrolyse zwei oder mehrere Monosaccharide liefern. Sie sind am Aufbau der pflanzlichen und tierischen Zellen und damit auch am Aufbau der Mikroorganismen beteiligt. Nach Pigmann (35) werden die Polysaccharide folgendermaßen eingeteilt:

1. Nach ihrer chemischen Funktion in Homopolysaccharide und Heteropolysaccharide.
   Die Homopolysaccharide liefern bei vollständiger Hydrolyse nur eine Art von Monosacchariden, die Heteropolysaccharide dagegen verschiedene Arten.

2. Nach ihrer biologischen Funktion in
   a) Struktur-Polysaccharide
   b) Reserve-Polysaccharide
   c) Polysaccharide mit unbekannter Funktion
   d) Polysaccharide der Mikroorganismen, die von einer großen immunbiologischen Bedeutung sind.

2. Chemischer Nachweis der Polysaccharide

Die Polysaccharide haben die Fähigkeit, sich an Eiweiß zu binden. Ob es sich um eine chemische oder eine Molekülverbindung handelt, ist noch nicht geklärt (Michel 30, Merchant und Packer 28).

Beim Nachweis der Polysaccharide ist zu beachten:

1. Sie geben negative Reduktionsproben (Fehling, Trommer, Nylander)
2. Sie haben keinen süßen Geschmack
3. Sie können keine Osazone bilden
4. Sie sind im allgemeinen nicht vergärbar (Fischbach 14)
5. Nach vollständiger Hydrolyse mit Säuren entstehen aus den Polysacchariden Monosaccharide, die positive Reduktionsproben geben und Osazon bilden (Jonson 21, Hallmann 18)
6. Die Molische Reaktion fällt positiv aus (Leuthardt 25).

3. Gewinnung der Polysaccharide

In der Literatur sind zahlreiche Methoden über die Gewinnung der Polysaccharide aus Bakterien beschrieben. Im allgemeinen werden ein- bis zweimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschene Bakterien nach verschiedenen Methoden gesprengt oder mit schwachen Säuren hydrolysiert (10, 19, 20). Nach der Hydrolyse erfolgt Eiweißfällung, Zentrifugieren, Dialysieren und als letztes Lyophilisieren.
Das Endprodukt ist ein grauweißes, hygroskopisches, leicht wasserlösliches Pulver, das den chemischen Reaktionen für Polysaccharidnachweise entsprechen muß (Jonson 21, Heidelberger, Oswald und Avery 19).

B. Biologische Bedeutung der von Bakterien gewonnenen Polysaccharide

Schon lange ist bekannt, daß Bakterien in ihrer Zellwand, ihrer Zellmembran oder Zellkapsel eine schleimige Substanz enthalten können (Merchant und Packer 28). Erst vor einigen Jahren entdeckte man die große Wichtigkeit dieser Substanz, und man stellte durch Analyse fest, daß es sich hier vorwiegend um Polysaccharide handelte.

Dochez und Avery (11) sowie Heidelberger, Oswald und Avery (19) isolierten in USA aus Pneumococcen ein von ihnen als "soluble specific substanz" bezeichnetes Polysaccharid. Sie fanden so-

wohl in der Zellwand der Bakterien als auch im Filtrat der Pneumococcen und in der Organflüssigkeit des infizierten Individuums dieselbe spezifische Substanz.

Diese Entdeckung brachte der Immunbiologie große Vorteile, da es nun möglich war, verschiedene Pneumococcen beim Menschen zu isolieren. Nicht weniger als 32 verschiedene Arten von Pneumococcen wurden dadurch differenziert (Merchant und Packer 28).

Von der Tatsache ausgehend, daß bei parenteraler Verabreichung bestimmter Stoffe (Antigene) die Antikörperbildung des Organismus angeregt wird (Marrack, Ergeb 26), fanden Avery, Heidelberger und Goebel (zit. nach 35) weitere wichtige Ergebnisse. Sie koppelten nämlich verschiedene synthetisch hergestellte Proteine mit einer Anzahl von Mono und Disacchariden und stellten fest, daß die Mono- und Disaccharide spezifisch mit dem ursprünglich hergestellten Antigen präzipitierten. Änderten sie die Mono- und Disaccharide und behielten dasselbe synthetisch hergestellte Protein bei, so ging die Spezifität verloren. Nahmen sie verschiedene Proteine und hängten dieselben Mono- und Disaccharide daran, so blieb die Spezifität der Präzipitation erhalten. Daraus ergab sich, daß die spezifische Reaktion nicht dem Eiweiß zuzuschreiben war, sondern den Polysacchariden. Außerdem wurde auch beobachtet, daß manche Polysaccharide der Pneumococcen (Typus I) ohne Zusatz von Proteinen eine volle antigene Wirkung zeigten. Otto und Felix (33) führten diese Erscheinung auf die Größe des Polysaccharidmoleküls zurück.

Die weitere biologische Bedeutung des spezifischen Polysaccharids beruht auf seiner Wirkung als "Hapten". Der Haptenbegriff wurde zuerst von Landsteiner eingeführt, der ihn folgendermaßen definiert hat (zit. nach 37): "Wenn ein Körper mit dem homologen Antikörper zwar in vitro reagiert, diesen Antikörper jedoch unter normalen Bedingungen nicht zu erzeugen vermag", handelt es sich um ein Hapten. Pigmann (35) definiert Haptene als Polysaccharide, welche eine Präzipitationsfähigkeit mit Antikörpern haben, die durch ein volles Antigen erzeugt wurden. Haptene selbst sind aber keine vollen oder kompletten Antigene, die Antikörper erzeugen können. Nach Schmidt (37) gilt aber auch der Haptenbegriff nur relativ. Es zeigte sich nämlich, daß Haptene, die beim Kaninchen als solche wirken, beim Menschen und bei Mäusen Vollantigene sein können.

Landsteiner und Simms (zit. nach 37) mischten Polysaccharide mit Schweineserum. Es gelang so, das Polysaccharid an einen Eiweißträger zu binden, der es zu einem Vollantigen machte. Es war aber nicht möglich, alle Polysaccharide zu einer solchen Verbindung zu bringen und sie auf diese Weise zu Vollantigenen zu komplettieren. Als Beispiel führen Landsteiner und Simms Kapselpolysaccharide der Pneumococcen an.

Die Beobachtung von Landsteiner und Simms, die das Schweineserum mit dem Polysaccharid mischten und so ein Vollantigen erzeugen konnten, erklärt Schmidt (37) folgendermaßen: Wenn man ein Schweineserum mit einem Polysaccharid mischt, kann es zu einer nebenvalenzartigen Bindung kommen. Diese Nebenvalzenbindung ist als Adsorption aufzufassen, wobei das Hapten als Adsorbens auftritt. Durch diese Eiweiß-Polysaccharid-Bindung erhält das Polysaccharid eine spezifische antigene Wirkung. Handelt es sich aber um reine Polysaccharide, die aus den Bakterien extrahiert wurden, und bei denen die Aktivierung (Adsorption) nicht möglich ist, bleibt die antigene Wirkung aus.

Schmidt (37) glaubt, daß es möglich ist, ein Hapten ohne Bindung an Eiweiß, nur durch Vergrößerung seines Moleküls, als Vollantigen zur Wirkung zu bringen. Er betrachtet demnach Haptene als Stoffe, die die Spezifität des Antikörpers bedingen. Dabei kann sich das Hapten mit dem spezifischen Antikörper verbinden (Präzipitation), es muß aber nicht immer so sein.

Von entscheidender biologischer Bedeutung ist aber auf jeden Fall, daß bei Verabreichung eines Haptens der Organismus keine Antikörper bildet, obwohl das Hapten in ganz spezifischer Art mit den schon vorhandenen Antikörpern reagiert. Daraus geht auch hervor, daß Polysaccharide keine unspezifischen Reaktionen hervorrufen dürfen. Das zeigen auch die Arbeiten von Burger (zit. nach 32).

C. Die Bedeutung der von Brucellen gewonnenen Polysaccharide

1909 ist die Allergendiagnostik bei der Brucellose zum ersten Mal in der Literatur beschrieben worden. Mc Fadyenn und Stockmann (zit. nach 4) verwendeten dazu Filtrate von Bangbakterien, die sie Rindern zu diagnostischen Zwecken subkutan injizierten. Später stellten andere Autoren Poly-

saccharide aus Brucellakulturen her (10, 19, 30). Die besten Erfolge sind dem Schweizer Mosimann (32) zuzuschreiben. Im Jahre 1949 gelang es Mosimann, aus verschiedenen Stämmen der Bangbakterien ein Polysaccharid zu extrahieren (4). Dieses Polysaccharid wird auch in der menschlichen Brucellosediagnostik als Allergen angewandt. Die Hauptmerkmale des Mosimannschen Polysaccharids sind, daß es nicht toxisch wirkt, bei mit Brucellen infizierten Individuen spezifische Hautreaktionen hervorruft und es zu keiner Sensibilisierung kommt.

III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

A. Vorversuche

1. Mechanische Zerstörung von Brucellen durch wiederholtes Gefrieren und Auftauen

Um das Polysaccharid aus den Bangbakterien in seiner möglichst natürlichen Form zu erhalten, habe ich zunächst versucht, die Brucellen ohne Einwirkung von Chemikalien zu zerstören. Dazu benützte ich die von Billaudelle und Worfringe (2) bei der Extraktion von Endotuberkulin angewandte Methode. Dieses Verfahren beruht auf osmotischer Disproportion, die durch wiederholtes Einfrieren (bei minus 60 bis 70° C) und Auftauen (bei plus 40° C) verstärkt wird. Die in Aq. dest. aufgeschwemmten Bakterien sollen dabei gesprengt werden.

1. Versuch

Material und Methodik

Ein nicht allzu pathogener und ohne CO_2-Zusatz wachsender Stamm (1119) von Brucella abortus wurde nach Überimpfung auf 120 Schrägagarröhrchen 48 Stunden lang bei 37° C im Brutschrank gezüchtet. Die nach dieser Zeit gewachsenen Kulturen wurden mit Aq. dest. in der Weise abgeschwemmt, daß von je 5 Versuchsröhrchen das erste mit 3 ccm Aq. dest. überschichtet und eine kurze Zeit geschüttelt wurde. Die so entstandene Suspension wurde nacheinander in die folgenden 4 Röhrchen umgeschüttelt, so daß von je 5 Röhrchen etwas mehr als 3 ccm einer grau-milchigen Suspension entstand.

Durchführung der Sprengung

Mit den insgesamt gewonnenen 73 ccm der Bakteriensuspension führte ich 3 Versuche mit je zehnmaliger Tiefkühlung bei minus 38° C und Auftauen bei plus 40° C durch. In den ersten zwei Versuchen verwendete ich je 25 ccm, im dritten 23 ccm. Zur Kontrolle der Bakterienzerstörung wurden die vorhandenen Bakterien auf ihre Strukturveränderungen und ihr Wachstum folgender-

maßen geprüft:

a) Ausstriche wurden nach Gram und Köster gefärbt

b) Petrischalen mit gewöhnlichem Nähr-Agar wurden beimpft.

Ergebnis

Die Ausstriche nach Gram und Köster zeigten nur eine Quellung der Bangbakterien. Eine Sprengung einzelner Bakterien konnte nicht festgestellt werden.

Die Bakterien zeigten in ihrem Wachstum keine Störung.

Eine Zerstörung der Brucellen mit der in Anlehnung an die Arbeiten von Billaudelle und Worfringe (2) durchgeführten Methode ist danach offensichtlich nicht gelungen. Da in diesem Versuch nur eine tiefste Temperatur von minus 38°C erreicht wurde, die oben angeführten Autoren aber eine Temperatur von minus 60 bis 70°C vorschreiben, habe ich noch einen zweiten Versuch mit Kohlensäuregefrierung durchgeführt.

2. Versuch

Material und Methodik

Es wurde das gleiche Material wie im ersten Versuch verwendet, jedoch insgesamt nur 30 ccm einer Bangbakteriensuspension. Die Gewinnung des Materials für die mechanische Zertrümmerung war die gleiche wie in Versuch 1.

Um die Temperatur von minus 60 bis 70°C annähernd zu erreichen, verwendete ich eine Kohlensaureflasche mit einer darauf montierten Düse.

30 ccm der Bangbakteriensuspension wurden in 3 Zentrifugengläschen (je 10 ccm) verteilt. Diese Gläschen wurden in ein aus Cellulose bestehendes Säckchen getan und der Kohlensäuregefrierung unterworfen. Nach 30 Sekunden war eine Temperatur von minus 50°C erreicht und die Suspension völlig eingefroren. Danach wurden die Röhrchen aus dem Cellulosesack herausgenommen und in einem Wasserbad von 40°C aufgetaut.

Dieser Vorgang wurde 20mal durchgeführt. Danach wurden die so vorbehandelten Bakterien auf ihre Strukturveränderungen und ihr Wachstum wie in Versuch 1 geprüft.

Ergebnis

Die Bakterien zeigten nach der Gram- und Kösterfärbung nur eine Quellung und keine Sprengung. Eine Beeinträchtigung des Wachstums auf der Agarplatte konnte ich nicht beobachten.

Die Versuche 1 und 2 haben gezeigt, daß es mit Hilfe der Methode von Billaudelle und Worfringe (2) nicht möglich gewesen ist, die Brucellen zu zerstören. Die Kapselwand der Brucellen, an deren Bildung Strukturpolysaccharide beteiligt sind, ist offensichtlich sehr resistent. Eine mechanische Sprengung der Kapsel mit dieser physikalischen Methode gelang deshalb nicht.

2. Zertrümmerung der Bakterien mit Hilfe eines mechanischen Zellhomogenisators

Material und Methodik

Die Herstellung der Ausgangssuspension der Brucellen (Stamm 1119) erfolgte wie in den vorigen Versuchen.

Durchführung der Sprengung

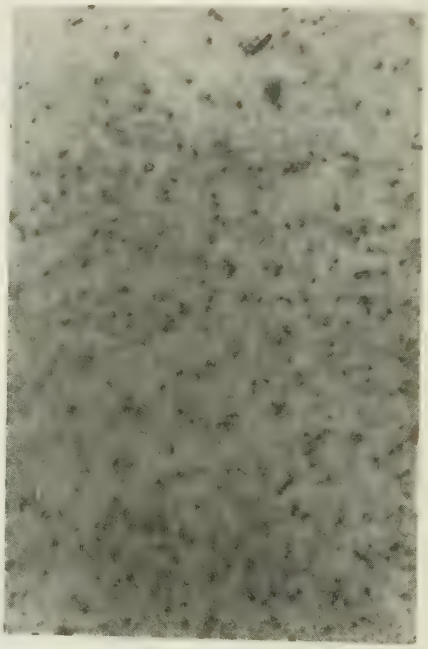
73 cm einer Bangbakteriensuspension vom Stamm 1119 wurden 20 Minuten bei 3500 U/Min. zentrifugiert. Der dadurch gewonnene Bodensatz wurde aus den einzelnen Zentrifugenröhrchen in die Glasflasche des Zellhomogenisators (Hersteller Firma B. Braun, Apparatebau, Melsungen) nach Merkenschlager, Schlossmann und Kurz (29) und mit physiologischer Kochsalzlösung auf 30 ccm aufgefüllt. Dazu gab ich 5 ccm Ballotinbeads (Glasperlen) mit einem Durchmesser von 0,1 mm. Danach wurde die Glasflasche verschlossen und in den Homogenisator eingesetzt. Durch exzentrische Rotation bei 3000 U/Min. unter gleichzeitiger Kühlung mit Kohlensäureschnee wurde die Bakteriensuspension 4 Minuten lang der mechanischen Zertrümmerung unterworfen. Nach diesem Vorgang hatte die Flüssigkeit einen milchigen Charakter. Die dieser Methode unterworfenen Bakterien wurden auf ihre Struktur und ihr Wachstum wie in Versuch 1 geprüft.

Ergebnis

Ausstriche nach Gram und nach Köster zeigten, daß die Bakterien zerstört waren. Bei Betrachtung in Ölimmersion sah das ganze Feld wie eine homogene Masse aus. In der Umgebung der einzelnen Glasperlen konnte man Reste der Bakterienkapseln erkennen (siehe Abb. 1 und 2).

Abb. 1
Vor dem Homogenisieren

Abb. 2
Nach dem Homogenisieren



Nach Überimpfung der homogenisierten Brucellensuspension auf Agarplatten konnten erst nach 72 Stunden einzelne Kolonien beobachtet werden, die die Größe einer Nadelspitze hatten.

Durch den mechanischen Zellhomogenisator nach Merkenschlager gelang es, die Bangbakterien des Stammes 1119 zu zerschlagen und eine nahezu homogene Masse des Zellinhalts der Bakterien zu erhalten. Diese Erkenntnisse zeigten, daß die Methode nach Merkenschlager für die Fortsetzung der Versuche zur Extraktion der Polysaccharide geeignet sein kann.

3. Fällung der Bakterienproteine mit $CuSO_4$ und Extraktion der Polysaccharide

Material und Methodik

Eine Brucellensuspension des Stammes 1119, die durch Abschwemmung von 60 Versuchsröhrchen mit physiologischer NaCl-Lösung gewonnen wurde, ist der mechanischen Zertrümmerung im Zellhomogenisator nach Merkenschlager unterworfen worden. Dieses Homogenisat (30 ccm) der Bangbakterien wurde für die weitere Extraktion des Polysaccharids verwendet.

Durchführung der Extraktion

Das Brucellen-Homogenisat wurde 30 Minuten lang bei 3500 U/Min. zentrifugiert und die dabei gewonnene überstehende Flüssigkeit (fadenziehend) durch ein Seitz-Filter filtriert. Dabei erhielt ich 15 ccm eines klaren, gelblich-braunen Filtrats. Dem Filtrat wurden 6 ccm gesättigte $CuSO_4$-Lösung zur Eiweißfällung zugesetzt, das Ganze 5 Minuten lang geschüttelt und anschließend 30 Minuten bei 3500 U/Min. zentrifugiert. Die überstehende bläuliche Flüssigkeit wurde abpipettiert und die darin noch vorhandenen $CuSO_4$-Ionen mit H_2S ausgefällt. Dazu wurde H_2S aus einem Kippschen Apparat im statu nascendi eingeleitet ($CuSO_4 + H_2S \rightarrow CuS + H_2SO_4$).

Beim Zusatz von H_2S kam es zur Schaumbildung; kurz danach verfärbte sich die Flüssigkeit immer dunkler, und es entstand ein schwarzer Niederschlag von CuS. Um die Flüssigkeit vom Niederschlag zu reinigen, wurde die gesamte Lösung 4mal je 20 Minuten mit 3500 U/Min. zentri-

fugiert. Um die SO_4-Ionen zu fällen gab ich 2 ccm $BaCl_2$ dazu, schüttelte das Ganze eine kurze Zeit und zentrifugierte anschließend 20 Minuten lang, um den Niederschlag zu trennen ($H_2SO_4 + BaCl_2$ $BaSO_4 + 2HCl$). Dieses Verfahren wurde mehrmals durchgeführt, bis die Flüssigkeit wasserklar blieb. Der infolge der HCl stark saure ph-Wert bedingte eine 48stündige Dialyse der Flüssigkeit unter der Wasserleitung. Die darauffolgende Lyophilisierung ergab 2 mg eines grau-weißen, stark hygroskopischen Pulvers.

Untersuchung dieses Pulvers auf Polysaccharid-Gehalt:
Auf Grund folgender Punkte wird eine Substanz nach Jonson (21) als Polysaccharid charakterisiert:

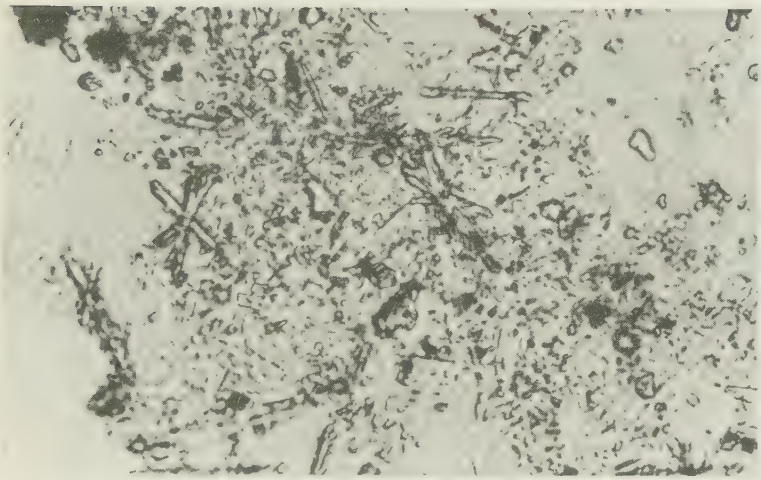
1. Das Pulver soll leicht wasserlöslich sein
2. Die Molische Probe soll in einer Verdünnung von 1 : 1 000 000 positiv sein (21, 25)
3. Die gewöhnlich verwendeten Eiweißproben sollen negativ ausfallen
4. Stickstoffgehalt
5. Fehlingsche Probe soll negativ sein
6. Keine Veränderung der Farbe auf Zusatz von Jodlösung
7. a) Eine Präzipitation mit gesättigtem Ammonium-Sulfat soll nicht eintreten
   b) Osazon-Probe soll positiv ausfallen.

Ergebnis

Das durch $CuSO_4$-Fällung gewonnene grauweiße, stark hygroskopische Pulver verhielt sich in den 7 Punkten wie folgt:

1. Es war nicht wasserlöslich
2. Die Molische Farbe war in einer Verdünnung von 1 : 1 000 000 positiv
3. Eiweißproben:
   Kochprobe negativ
   Biuret-Probe (nach 18, 25, 39) schwach positiv
   Hellersche-Probe (nach 18, 25, 39) schwach positiv
4. N-Bestimmung nicht durchgeführt
5. Die Fehlingsche Probe fiel negativ aus
6. Es trat keine Farbveränderung bei Jodzusatz ein
7. a) Nach Zusatz von gesättigtem Ammonium-Sulfat bildete sich ein Präzipitat
   b) Die Osazon-Probe fiel positiv aus (siehe Abb. 3).

Abb. 3



Das Ergebnis entspricht in den Punkten 1, 3 und 7 a) nicht der Anforderung nach Jonson (21). Folglich handelte es sich bei der extrahierten Substanz nicht um reines Polysaccharid.

B. Hauptversuche

1. Zerstörung der Bakterien durch Säureeinwirkung mit anschließender Hydrolyse

Da im Vorversuch die verschiedenen Sprengungsmethoden und die Eiweißfällung mit $CuSO_4$ zu keinem befriedigenden Ergebnis geführt hat, zerstörte ich im Hauptversuch die Brucellen durch Hydrolyse mit HCl und fällte das Eiweiß mit Trichloressigsäure.

Material und Methodik

Als Brucellenstamm ist der abgeschwächt virulente Stamm Buck 19, der auf gewöhnlichem Agar gezüchtet wurde, verwendet worden.

16 Kolle-Flaschen wurden mit Bangbakterien des Stammes Buck 19 beimpft und danach 48 Stunden bei 37°C im Brutschrank bebrütet. Die nach dieser Zeit gewachsenen Kulturen wurden mit physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt (Gesamtmenge 125 ccm) und danach zwei verschieden langen Hydrolysen unterworfen.

Durchführung der Hydrolyse:

a) 62,5 ccm der Buck 19-Suspension wurden mit 62,5 ccm einer konzentrierten Salzsäurelösung gemischt. Diese Flüssigkeit hydrolysierte ich in einem Rückflußkühler 20 Minuten lang. Zur Entfernung der Säure folgte eine 72stündige Dialyse mit Leitungswasser. Damit der Dialysierschlauch aus Polyäthylen durch die starke Säure nicht zerstört wurde, verdünnte ich die Lösung mit Aq. dest. im Verhältnis 1 : 2. Der ph-Wert nach der Dialyse betrug 6,8. Eine nachfolgende Lyophilisierung (zur Verminderung der Flüssigkeitsmenge) von 24 Stunden ergab ein grau-weißes, stark hygroskopisches Pulver in einer Menge von 350 mg.

b) 62,5 ccm der Buck 19-Suspension wurden mit der gleichen Menge konzentrierter HCl-Lösung gemischt und 35 Minuten lang im Rückflußkühler hydrolysiert. Dann wurde wie bei a) weiter verfahren. Die Ausbeute an lyophilisierter Substanz betrug 340 mg.

2. Fällung der Bakterienproteine mit Trichloressigsäure und Extraktion des Polysaccharids

Die in Versuch 1a) und 1b) durch Hydrolyse, Dialyse und Lyophilisation gewonnene Substanz wurde getrennt folgendermaßen weiter bearbeitet:

Methodik:

Zu 350 mg Substanz (Versuch 1a) bzw. 340 mg Substanz (Versuch 1b) wurden je 220 ccm Aq. dest. zugesetzt. Der ph-Wert der entstandenen Lösung betrug 3,5. Beide Lösungen wiesen ein geringes Sediment auf, das durch Zentrifugieren bei 3500 U/Min. entfernt wurde. Nach Abpipettieren der überstehenden bräunlichen Flüssigkeit in zwei Erlenmeyer-Kolben gab ich in jeden Kolben 3 g Trichloressigsäure, um das in der Lösung vorhandene Eiweiß zu fällen. Das sofort ausfallende Eiweiß wurde durch 30 Minuten langes Zentrifugieren bei 3500 U/Min. entfernt. Die überstehende gelb-braune Flüssigkeit hatte einen ph-Wert von 1.

Die stark saure Reaktion der Flüssigkeit erwies sich der nun folgenden Lyophilisierung als hinderlich. Versuche zeigten, daß durch den Wasserentzug bei der Lyophilisierung die Konzentration der Trichloressigsäure zunahm und schließlich zur Verkohlung des Pulvers führte. Um dies zu vermeiden, wurden die aus den beiden Hydrolysaten gewonnenen Flüssigkeiten vor der Lyophilisierung wieder einer 24stündigen Dialyse unterworfen. Dadurch verschob sich der ph-Wert von 1 auf 7, und die Lyophilisierung konnte durchgeführt werden. Das so gewonnene Pulver wurde, wie im Vorversuch 3, auf seine Eigenschaft als Polysaccharid geprüft.

Ergebnis:

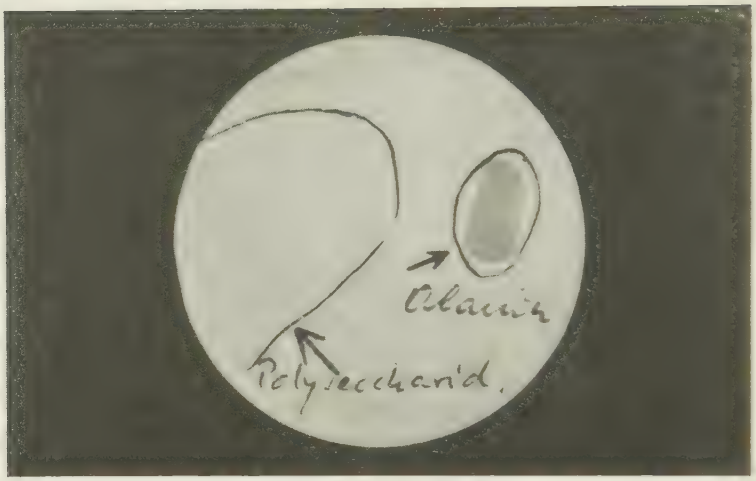
Von dem 20 Minuten-Hydrolysat erhielt ich nach dieser Methode 3,8 mg, von dem 35 Minuten-Hydrolysat 8,1 mg eines bräunlichen, stark hygroskopischen Pulvers. Bei der Prüfung dieser Substanz (je 1 mg von beiden Versuchen plus 3 ccm Aq. dest.) auf seine Polysaccharideigenschaften nach Jonson (21) ergaben sich folgende Resultate:

1. Die Substanz war leicht wasserlöslich
2. Die Molische Probe war positiv
3. Die durchgeführten Eiweißproben, Kochprobe (nach 25), Biuretprobe (nach 17) Hellersche Ringprobe (nach 18) fielen negativ aus
4. Stickstoffgehalt: Anstelle der N-Bestimmung nach Kjeldal wurde die Nynhydrin-Probe nach Klages (21) durchgeführt, die spezifisch auf Aminosäuren ist. Die Probe, bei der Alanin als Kontrolle verwendet wurde, fiel negativ aus (Abb. 4)
5. Die Fehlingsche Probe auf reduzierende Zucker vor der Hydrolyse war negativ. Sie fiel auch nach 30minütiger Hydrolyse mit 1-normaler Salzsäure negativ aus
6. Nach Zusatz von Jodlösung trat keine Farbveränderung ein

7a) Keine Präzipitation nach Zusatz von gesättigter Ammoniumsulfatlösung

b) Nach Hydrolyse wie bei 5) wurde eine Osazonprobe angesetzt, die positiv ausfiel. Es traten Glukosazonkristalle auf (Hallmann 18).

Abb. 4



Besprechung der Ergebnisse

Nachdem ich in Versuch 1 durch Hydrolyse die Bangbakterien Buck 19 zerstört und die entstandene homogene Flüssigkeit in Versuch 2 der eigentlichen Extraktion der Polysaccharide unterworfen hatte, ergab die Prüfung nach Jonson (21), daß die isolierte Substanz mit Ausnahme von Punkt 5 alle an ein Polysaccharid gestellten Forderungen erfüllte. Jonson verlangt in Punkt 5, daß ein Polysaccharid, da es keine reduzierende Wirkung hat, Fehling-negativ ist. Dies ergab auch das von mir hergestellte Polysaccharid. Die weitere Forderung aber, daß ein Polysaccharid nach 30minütiger Hydrolyse mit 1 n-Salzsäure (wodurch es zu Monosacchariden abgebaut werden soll) durch die reduzierende Wirkung der Monosaccharide eine positive Fehlingsche Probe geben muß, erfüllte das von mir hergestellte Polysaccharid nicht. Nach Jendrusch (20) fällt allerdings auch bei den von Mosimann (31) sowie Ottosen und Plum (34) hergestellten Polysacchariden aus Bangbakterien, die zur allergischen Diagnostik bei Rindern und Schweinen verwendet werden, nach Hydrolyse die Fehlingsche Probe negativ aus.

Zur weiteren Klärung dieser Frage führte ich deshalb eine quantitative Zuckerbestimmung nach Hagedorn-Jensen (17) durch. Sie fiel positiv aus. Das

20 Minuten-Hydrolysat ergab 27 mg%, das 35 Minuten-Hydrolysat 30 mg%. Dieser geringe Zuckergehalt kann wahrscheinlich mit der Fehlingschen Probe gar nicht erfaßt werden, und ich sehe das als Grund dafür an, daß die verschiedentlich hergestellten Polysaccharidextrakte aus Brucellen, ebenso wie das von mir hergestellte Präparat eine negative Zuckerprobe gaben. Unter Berücksichtigung dieses Umstandes glaube ich trotzdem sagen zu können, daß das von mir hergestellte bräunliche, stark hygroskopische, leicht wasserlösliche Pulver ein aus den Bangbakterien Buck 19 stammendes Polysaccharid in sehr reiner Form darstellt.

3. Allergische und serologische Untersuchungen an Meerschweinchen

Zweck dieser Untersuchungen war es, an infizierten Meerschweinchen zu prüfen, ob das gewonnene Polysaccharid bei intrakutaner Injektion eine diagnostisch verwertbare Hautreaktion hervorrief. Außerdem sollte untersucht werden, ob das Polysaccharid ein Hapten darstellte und ob es in Verbindung mit Schweineserum zu einem Vollantigen werden kann.

a) Intrakutantest an banginfizierten Meerschweinchen

Material und Methodik

4 Meerschweinchen (419, 420, 431, 432) wurden mit je 1 ccm einer Bangbakterien-Suspension des Stammes 1119 intraperitoneal infiziert. 4 gesunde Meerschweinchen (452, 453, 454, 455) dienten als Kontrollen. Nach 16 Tagen gewann ich durch Herzpunktion von jedem Meerschweinchen 2 ccm Blut, das bei Zimmertemperatur nach kurzer Zeit zur Gerinnung kam. Nach 12 Stunden wurden die Röhrchen 10 Minuten lang bei 2500 U/Min. zentrifugiert, das überstehende Serum abpipettiert und mit ihm eine Langsamagglutination angesetzt. 72 Tage nach der Infektion wurde auf die gleiche Art und Weise eine weitere Blutuntersuchung durchgeführt.

Um die allergischen Versuche mit den von mir hergestellten Polysacchariden durchführen zu können, bereitete ich von den zwei durch verschieden lange Hydrolyse gewonnenen Präparaten (Versuch 2) je zwei Lösungen. Einmal nahm ich 0,1 mg der Polysaccharide und löste sie in 0,9 ccm physiologischer Kochsalzlösung. Als zweite Verdünnung löste ich 1 mg der Polysaccharide in 0,9 ccm physiologischer Kochsalzlösung. Den ph-Wert stellte ich mit Hilfe des Sörensen-Puffers auf 6,8 ein. Zusammen mit der ersten Blutentnahme

(16 Tage p. i.) applizierte ich dann je 0,1 ccm dieser Flüssigkeiten intrakutan gleichzeitig an 4 infizierte und 4 Kontrollmeerschweinchen. Pro Tier wurden also von jedem Polysaccharid 0,1 mg und 0,01 mg verabreicht. Die Hautreaktion wurde nach 4, 12 und 24 Stunden abgelesen, wobei auf Rötung und lokale Nekrose geachtet wurde.

Untersuchungsergebnis

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in der folgenden Tabelle 1 zusammengestellt worden. Als Polysaccharid A wurde das 20 Minuten-Hydrolysat, als Polysaccharid B das 35 Minuten-Hydrolysat bezeichnet.

In der Tabelle bedeuten:

s.R. = schwache Rötung der Injektionsstelle
mmR. = Durchmesser der Rötung in mm
N. = Nekrose an der Injektionsstelle.

Tabelle 1

Hautreaktionen bei banginfizierten und gesunden Meerschweinchen

Nr. des Meerschw.	Endtiter d. Agglutinat. 16 Tg. p. i.	Hautreaktion 16 Tge. p. i.											
		Polysaccharid A						Polysaccharid B					
		Dosis 0,1 mg			Dosis 0,01 mg			Dosis 0,1 mg			Dosis 0,01 mg		
		Stunden			Stunden			Stunden			Stunden		
		4	12	24	4	12	24	4	12	24	4	12	24
419	1:160 +	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
420	1:320 +	-	-	-	-	-	-	-	-	s.R.	-	-	s.R
431	1:320 +++	-	-	-	-	-	-	-	-	s.R.	-	-	s.R.
432	1:320 +++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kontrollen													
452	1:20 -	-	-	-	-	-	-	-	-	s.R.	-	-	s.R.
453	1:20 -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
454	1:20 -	-	-	-	-	-	-	-	-	3 mm N	-	-	3mmR N
455	1:20 -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

b) Sensibilisierungsversuche an Meerschweinchen mit einem Gemisch von Polysaccharid und Meerschweinchenserum

Material und Methode

Je 2 mg des von mir hergestellten Polysaccharids aus Brucellen des Stammes Buck 19 wurden in 0,2 ccm physiologischer NaCl gelöst (ein ganz schwaches Sediment trat auf) und danach 1,8 ccm Schweineserum zugesetzt. Diese Lösung blieb zur Adsorption eine Stunde bei Zimmertemperatur stehen und wurde danach an zwei Meerschweinchen in der Menge von 0,5 ccm subkutan appliziert. Nach 3 Tagen wurde bei beiden Tieren die Injektion mit je 0,5 ccm wiederholt.

Zur Kontrolle wurde 2 Tieren gleichzeitig reines Schweineserum (je 0,5 ccm im Abstand von 3 Tagen) und 2 Tieren reines Polysaccharid (je 0,1 mg) subkutan verabreicht.

Nach 16 Tagen wurden durch Herzpunktion von jedem Meerschweinchen 4 ccm Blut entnommen und mit dem Serum eine Langsamagglutination mit Brucella-Antigen und eine Präzipitation mit Polysaccharidlösung nach der von Bürki (6) beschriebenen Methode durchgeführt.

Untersuchungsergebnisse

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 2 zusammengestellt worden.

Tabelle 2

Ausfall der Langsamagglutination und der Präzipitation

Nr. der Meerschweinchen	Ergebnisse der Agglutination mit Brucella-Antigen				Ergebnisse der Präzipitationsreaktion mit Polysaccharid		
	1:5	1:10	1:20	1:40	0,1%	0,01%	0,001%
Schweineserum + Polysaccharid							
465	-	-	-	-	-	-	-
457	-	-	-	-	-	-	-
Schweineserum allein							
458	-	-	-	-	-	-	-
459	-	-	-	-	-	-	-
Polysaccharid allein							
460	-	-	-	-	-	-	-
461	-	-	-	-	-	-	-

c) Besprechung der Ergebnisse

Wie aus Tabelle 1 zu ersehen ist, zeigten die Meerschweinchen nach der Infektion mit dem Stamm 1119 einen verhältnismäßig niedrigen Titer. Der Grund dafür liegt in der verhältnismäßig geringen Virulenz dieses Stammes.

Die Versuche, die in Tabelle 1 zusammengefaßt sind, ergaben, daß von den infizierten Meerschweinchen Nr. 420 und 431 mit Polysaccharid B nach 24 Stunden mit einer schwachen Rötung reagierten. Bei den anderen 2 Tieren kam es zu keinen Hautreaktionen. Von den gesunden Tieren wiesen aber ebenfalls 2 von 4 Meerschweinchen (Nr. 452, 454) nach 24 Stunden schwache

Rötung bzw. sogar Nekrose auf. Ein Unterschied zwischen infizierten Tieren und gesunden Meerschweinchen ist somit überhaupt nicht aufgetreten. Dies zeigt, daß sich das von mir isolierte Polysaccharid zur allergischen Diagnose der Brucellose nicht eignen dürfte. Meine Ergebnisse stehen daher im Gegensatz zu den Ergebnissen anderer Untersucher (10, 15, 31, 34), deren Polysaccharidfraktionen der Brucellen allergene Eigenschaften aufwiesen.

Aus Tabelle 2 ersieht man, daß das Polysaccharid bei subkutaner Applikation weder allein noch mit Schweineserum gemischt agglutinierende oder präzipitierende Antikörper im Meerschweinchenorganismus hervorrief. Eine Umwandlung der Substanz in ein Vollantigen ist also nicht eingetreten. Unter Berücksichtigung der von Schmidt (37) vertretenen Theorie, daß der Haptenbegriff nur relativ aufzufassen ist, glaube ich den negativen Ausfall des Adsorptionsversuches damit erklären zu können, daß es sich bei dem Polysaccharid um eine Substanz handelte, die in sehr reiner Form vorlag und deshalb keine Bindung an Proteine mehr einging.

IV. DISKUSSION

Schon lange bemühte man sich, für die Brucellose-Diagnostik eine verläßliche allergische Untersuchungsmethode zu finden. Zahlreiche Autoren haben in dieser Absicht bereits Extrakte aus Abortus Bang-Bakterien hergestellt (10, 15, 31, 32, 34). Wie aus der Literatur hervorgeht, stellt aber keines dieser Präparate ein zuverlässiges Diagnostikum dar.

Der von mir nach Säurehydrolyse mit HCl aus Brucellen des Stammes Buck 19 gewonnene Polysaccharidextrakt bildet, was seine diagnostische Anwendbarkeit betrifft, davon keine Ausnahme. Wie meine eigenen Tastversuche und die Untersuchungen von Behr (1) an kleinen Versuchstieren und Rindern gezeigt haben, kam es bei infizierten Tieren nach intrakutaner Verabreichung zu keinen allergischen Hautreaktionen. Der Polysaccharidextrakt war aber auch nicht in der Lage, allein oder nach Adsorption mit Schweineserum bzw. Aluminiumhydroxyd (1) spezifische Antikörper zu erzeugen. Es handelt sich also um eine Substanz, die weder selbst Antikörper zu erzeugen noch mit vorhandenen Antikörpern zu reagieren vermag. Nach Schmidt (37) kommt es dazu vor allem bei reinen Polysacchariden. Solche Substanzen lassen sich nicht immer an Proteine adsorbieren und können dann auch nicht zu einem Vollantigen werden. Landsteiner-Simms (zit nach 37) ist eine solche Komplettierung bekanntlich durch die Adsorption von Schweineserum an die von ihnen hergestellten Kapselpolysaccharide von Pneumococcen gelungen. Nach Schmidt (37) ist die antigene Wirkung aber nicht nur von einer Polysaccharid-Eiweiß-Bindung abhängig, sondern sie kann auch an die Molekülgröße des Polysaccharids gebunden sein. Ich vermute, daß dieser Faktor bei dem negativen Ausfall meiner allergischen Versuche die entscheidende Rolle gespielt hat. Durch die Säurehydrolyse und die nachfolgende Bearbeitung habe ich vermutlich Brucellen Polysaccharide eines sehr hohen Reinheitsgrades gewonnen. Ich halte es aber für möglich, daß durch die Anwendung von konzentrierter Salzsäure nicht nur eine restlose Spaltung der Polysaccharid-Eiweißverbindungen eingetreten ist, sondern es auch zu einem beginnenden Abbau der spezifischen Polysaccharidkomplexe der Brucellen und damit zu einer Molekülverkleinerung kam. Ob durch eine schonendere Hydrolyse die spezifischen antigenen bzw. haptenen Eigenschaften besser erhalten bleiben, muß durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

V. ZUSAMMENFASSUNG

1. Bei der Herstellung eines Polysaccharid-Extraktes aus Brucellen wurde zunächst versucht, die Keime mechanisch durch wiederholtes Gefrieren und Auftauen bzw. im Zellhomogenisator zu sprengen. Eine Zerstörung der Keime durch Säurehydrolyse (HCl) erwies sich jedoch für den weiteren Arbeitsgang als geeigneter.

2. Nach Fällung der Proteine mit Trichloressigsäure, Dialyse und anschließendem Lyophilisieren konnte ein bräunliches, stark hygroskopisches und leicht wasserlösliches Pulver gewonnen werden. Diese Substanz entsprach den Anforderungen, die von Jonson an den Nachweis eines Polysaccharids gestellt werden.

3. Intrakutane Injektionen von 0,01 bzw. 0,1 mg Substanz lösten bei mit Brucellen infizierten Meerschweinchen keine allergischen Hautreaktionen aus.
   Bei nicht infizierten Kontrolltieren führten diese Injektionen zu keiner Bildung von agglutinierenden Antikörpern.

4. Versuche, die Substanz an einen Eiweißkörper (Schweineserum) zu adsorbieren und so analog zu den Versuchen Landsteiners ein spezifisches Vollantigen zu schaffen, schlugen fehl.

V. LITERATUR

1. Behr, I.: Untersuchungen über die antigene und allergene Wirkung eines aus Brucella abortus hergestellten Polysaccharids
Vet. med. Diss. München 1959 (noch unveröffentlicht)

2. Billaudelle, H., L. E. Worfringe: "Endotuberculin", ein Antigenkomplex, gewonnen aus lebendem Myobacterium tuberculosis
Z. f. Imm. Forschg. 114, 344-348 (1957)

3. Burger, M.: Bacterial Polysaccharides
Ch. Thomas, Springfield USA (1950)

4. Bürki, F., Chr. Margadant und W. Mosimann: Diagnose der Rinderbrucellose durch einen Kutantest mit einem Polysaccharid-Allergen aus Brucella abortus
Schweiz. Z. Path. Bakt. 18, 1147-1156 (1956)

5. Bürki, F.: Kutantest und Präzipitation des Blutserums mit einer nicht agglutinogenen Fraktion aus Brucella abortus bei Meerschweinchen nach Infektion mit lebenden Bangbakterien. Zeitliches Auftreten und Verschwinden eines positiven Kutantestes und einer positiven Präzipitation
Z. Hyg. 143, 587 (1957)

6. Bürki, F., W. Mosimann: Diagnose der Rinderbrucellose durch einen Kutantest mit einem nichtagglutinogenen Allergen aus Brucella abortus
Int. Arch. Allergy. 8, 193-207 (1956)

7. Dieselben: Diagnose der Rinderbrucellose durch einen Kutantest mit einem nichtagglutinogenen Allergen aus Brucella abortus
Int. Arch. Allergy. 9, 265-272 (1956)

8. Bürki, F.: Kutantest und Präzipitation des Blutserums mit einer nichtagglutinogenen Fraktion aus Brucella abortus bei Meerschweinchen nach Infektion mit lebenden Bangbakterien
Zbl. vet. med. 4, 573-580 (1957)

9. Bürki. F.: Kutantest und Präzipitation des Blutserums mit einer nichtagglutinogenen Fraktion aus Brucella abortus bei Meerschweinhen nach Infektion mit lebenden Bangbakterien
Z. Hyg. 143, 593-598 (1957)

10. Diernhofer, K.: Zur Diagnose der Rinderbrucellose mit der Intrakutanprobe
DTW 62, 401-403 (1955)

11. Dochez, A.R. und O.T. Avery: Immunopolysaccharides
J. Exper. Med. 26, 477 (1917)

12. Fraser, D.: Bursting Bacteria by Release of Gas Pressure
Nature 167

13. Fischer, E., W. Niebel: Über das Verhalten der Polysaccharide gegen einige Sekrete und Organe
Ref. Akad. d. Wiss. zu Berlin 73 (1896)

14. Fischbach, E.: Grundriß der Physiologie und Physiologischen Chemie
Steinicke, München, 6, 28 (1954)

15. Godglück, K. und R. Schindler: Die Anwendung eines Brucella-Polysaccharids bei der allergischen Intrakutanprobe zur Diagnose der Schweinebrucellose
Wiss. Beiträge f. d. tierärztl. Praxis
Marburg (1954) S. 37-44

16. Goebel, W.F., O.T. Avery und F.H. Babers: Specificity of carbohydrates
J. Exper. Med. 60, 599 (1934)

17. Hagedorn-Jensen: Taschenbuch der Medizinisch-Klinischen Diagnostik
Bergmann, München (1949) S. 232

18. Hallmann, L.: Klinische Chemie und Mikroskopie
Thieme, Stuttgart (1954) S. 78 und 190

19. Heidelberger, M. T. Oswald und O. T. Avery: The soluble Specific Substance of Pneumococcus
J. Exper. Med. 14, 301-316 (1924)

20. Jendrusch, H.: Die Brauchbarkeit von allergischen Intrakutantesten zur Diagnose der Rinder- und Schweinebrucellose
Mh. Vet. Med. 12, 561-564; 562 u. 563 (1957)

21. Jonson, J., S. Rasch, A. Strand: Preparation and properties of water soluble fractions
Acta Path. Scand. 37, 449-458 (1955)

22. Klages, F.: Lehrbuch der Organischen Chemie
Gruyter, Berlin (1953) S. 834-835

23. Köstner, A.: Immunisierungsversuche mit abgetöteten Abortus-Bang-Kulturen an trächtigen Meerschweinchen
Vet. med. Diss. München 1951, S. 1

24. Landsteiner-Simms: zit. nach H. Schmidt (37)

25. Leuthardt, F.: Lehrbuch der Physiologischen Chemie
Gruyter, Berlin (1955) S. 34-90

26. Marrack, J. und Ergeb: Substanzen - Antigen genannt
Enzymforschg. 7, 281 (1938)

27. Mcfadyenn, F., S. Stockman: zit. nach Bürki (4)

28. Marchant, I. R. A. R. A. Packer: Nature of Antigen
Veterinary Bacteriology and Virology
Ames, Iowa USA (1956) S. 169-170
S. 42- 43

29. Merkenschlager, M., K. Schloßmann, W. Kurz: Ein mechanischer Zellhomogenisator und seine Anwendbarkeit auf biologische Probleme
Biochem. Z. 329, 332-340 (1957)

30. Michel, F.: Chemie der Zucker- und Polysaccharide
Akad. Leipzig (1939) S. 564-565

31. Mosimann, W.: Endotoxinextraktion aus Brucella abortus mit Trichloressigsäure
Schweiz. Z. Path. Bakt. 12, 362 (1949)

32. Niznansky, F., V. Krcméry, L. Ofúkaný: Die Bereitung, Auswertung und praktische Verwendbarkeit von Brucella-Polysaccharid in der komplexen Diagnostik der Brucellose in der Praxis
Arch. exper. Vet. Med. 57/58, 429-441 (1956)

34. Ottosen, H. E. und N. Plum: Intradermal Brucellosis Tests in Cattle with a Non-Antigenic Agent Report of the XIVth. International Veterinary Congress, London (1949) 2, 173-178

35. Pigmann, W. W.: Chemistry of the Carbohydrates
(1948) S. 425 New York

36. Raistick, H. und W. W. C. Topley: Complete antigens
Brit. J. Exper. Path. 15, 113 (1934)

37. Schmidt, H.: Fortschritte der Serologie
Steinkopf, Darmstadt (1955) S. 1-17

38. Thomas, W., J. Morgan: Studies in Immuno Chemistry
J. Biochem. 30, 909-925 (1936)

39. Waldschmidt, E., Leitz: Chemie der Eiweißkörper
Enke, Stuttgart (1950)

- - - - - -

An dieser Stelle sage ich Herrn Prof. Dr. A. Meyn verbindlichen Dank für die Überlassung des Themas sowie für die jederzeit freundliche Förderung meiner Arbeit.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Dr. Th. Schließer für die mannigfachen Anregungen und die freundliche Durchsicht des Manuskriptes.

Lebenslauf

Am 17. Juli 1927 wurde ich als Sohn des Kaufmanns Georg Wolf und seiner Ehefrau Margarete, geb. Hauser, in Cadjavica (Jugoslawien) geboren.

In Brčko besuchte ich die Volksschule und später das Gymnasium in Belgrad. Das Abitur machte ich 1947 auf dem Oberrealgymnasium in Efferding (O.-Österreich).

Das Studium der Tiermedizin begann ich im Wintersemester 1947 an der Tierärztlichen Hochschule zu Wien und wanderte 1950 in die USA aus. Dort konnte ich aus finanziellen Gründen das Studium nicht fortsetzen und erlernte deshalb in den Jahren 1950 - 1953 das Elektrikerhandwerk. Anschließend daran leistete ich von 1953 - 1955 meine Dienstpflicht in der Amerikanischen Armee ab und konnte mit Hilfe eines Stipendiums 1955 in Zürich das Studium wieder fortsetzen. 1956 wechselte ich an die Universität München über, wo ich im Sommer 1959 mit dem Staatsexamen abschloß.